

利用免疫膠體金方法觀察細胞內豬傳染性 胃腸炎病毒分佈之微細構造

27-6

黎南榮 林榮培 黃天祥

台灣省家畜衛生試驗所

利用豬傳染性胃腸炎病毒抗血清或該病毒之單株抗體與A蛋白膠體金免疫電顯負染色法可特異性的測定該病毒，此種敏感性極高之免疫法可用於部份純化及病毒量較少之檢體。

培養於CPK細胞之豬傳染性胃腸炎病毒經過L.R. White 包埋及膠體金染色，可於粗糙網狀內皮組織，類似融酶體顆粒，或病毒集團上見到特異性的15 nm膠體金染色，經過不同病毒及抗血清之試驗，證實A蛋白膠體金可作為通用性的金染色，而不必再以特異性初次抗體或二次抗體吸附於金粒子，且不會喪失其特異性及敏感性，也不會增加背景染色。

利用免疫學方法可提供抗原與宿主細胞間相互關係的有關資料，以過氧化酵素—抗過氧化酵素(PAP)及鐵蛋白(ferritin)法來進行，雖然效果不錯，但因其對比度及特異性較差，不足以提供足夠的研究所需資料，為了克服此困難，自Faulk及Taylor於1971年首先利用膠體金作為標示抗體進行免疫電子顯微鏡研究以來，膠體金染色目前已廣為學者應用^(2,3)。膠體金因其原子量大，對比度極高使非特異性反應減至最低⁽⁴⁾。一般而言膠體金粒子愈小其特異性及解析力愈強。豬傳染性胃腸炎為豬之重要傳染病對仔豬之育成關係極為重要⁽⁵⁾。本年度計畫以免疫膠體金法研討豬傳染性胃腸炎病毒於細胞之繁殖情形，及以膠體金負染色法鑑定豬傳染性胃腸炎病毒之可行

性。

材料與方法

1. 稀釋液：

供血清，檢體稀釋及沖洗用，其成份為含5%牛血清白蛋白之0.1M磷酸緩衝液。

2. 豬傳染性胃腸炎病毒抗血清：

豬隻經初代免疫豬傳染性胃腸炎病毒後補強注射而得。

3. 豬傳染性胃腸炎單株抗體：

由台灣省養豬科學研究所分讓。

4. A蛋白膠體金：

購買自Amersham Auroprobe EM protein A G15 RPN 439，膠體金粒子大小為15 nm。

5. 超薄切片免疫染色：

CPK 細胞接種 TGE 病毒於 12, 24 及 36 小時以含 0.5% Glutaraldehyde (GA)、5% Paraformaldehyde 與 3.5% Sucrose 之固定液，固定一小時。經沖洗，酒精階段脫水至 70% 後利用 L.R. White 浸潤隔夜，第二日以新鮮 L.R. White 浸潤 4 小時後包埋於 gelatin capsule 經 50°C 24 小時聚合，厚切選取適當部位再薄切成 60~90 nm 厚度以 300 mesh 之鏤網片收集。染色時先以稀釋液浸潤 30 分鐘，再與抗 TGE 之抗血清於 4°C 感作一夜，次晨以稀釋液沖洗 3~5 次後與 Protein A Colloidal Gold 感作二小時再以稀釋液沖洗 3~5 次，後以鈾及鉛進行雙重染色。

6. 免疫負染色：

取初步純化之病毒液與抗血清於 4°C 感作一夜，遠心除去上清液再以稀釋液沖洗兩次，以 20 倍稀釋之 A 蛋白膠體金 4°C 感作 6 小時後清洗，以磷鎢酸鉀 (PTA) 負染色鏡檢。

結 果

CPK 細胞接種 TGE 病毒 12 小時後，在細胞核可見明顯的核染色質周邊化現象，感染 24 小時後亦可見細胞核染色質周邊化現象且細胞質有空泡現象，於周邊化的細胞核染色質及空泡內，類似融酶體均有特異性的膠體金染色 (圖 1

)。經與 GA 固定 Epon 包埋之組織塊比對，此類似融酶體極可能為形成 TGE 病毒的先驅物質。感染 36 小時於細胞質之粗糙網狀內皮組織，空泡及細胞外皆可見到特異性之膠體金染色 (圖 2, 圖 3)。

負染色時於豬抗血清組及單株抗體組皆可見到特異性的病毒聚集及膠體金染色 (圖 4, 圖 5)。而於細胞碎片及背景均未見到金粒子，證實其特異性極高。

討 論

膠體金染色因其特異性及對比度高為一良好的研究抗原分佈之方法，但為了保存其抗原性，常須考慮標本之固定方法。一般電顯常用之 2.5% 戊二醛 (Glutaraldehyde) 及 1% 四氧化鐵 (Osmium Tetraoxide) 固定法雖對組織之微細結構保存良好，但亦使其抗原性消失。為了保存組織之抗原性常須將戊二醛之濃度降低而以三聚甲醛 (Paraformaldehyde) 取代。且省略四氧化鐵。因而使組織之結構固定較差。包埋劑目前趨向於使用親水性之 L.R. White。因其可於 70% 酒精濃度即進行包埋且聚合之溫度為 50°C，對抗原性之損失較小，使其特異性提高。在判讀時因固定劑及包埋劑之影響使組織之微細結構保存較差，故需充份瞭解細胞之微細結構以利判定。

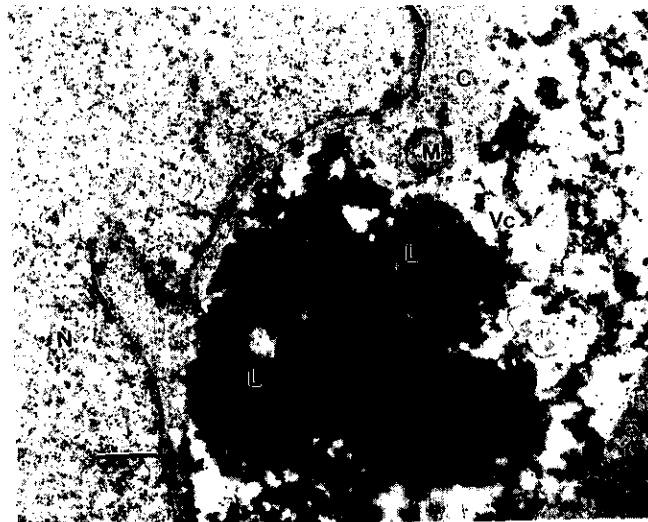


圖 1 CPK 細胞接種 TGE 病毒 24 小時 Protein A-Gold 進行膠體金染色，於細胞質空泡內類似 Lysosome 顆粒處有特異性的膠體金染色。

N: Nucleus Vc: Vacuole L: Lysosomelike particle
C: Cytoplasm M: Mitochondria bar = 500nm

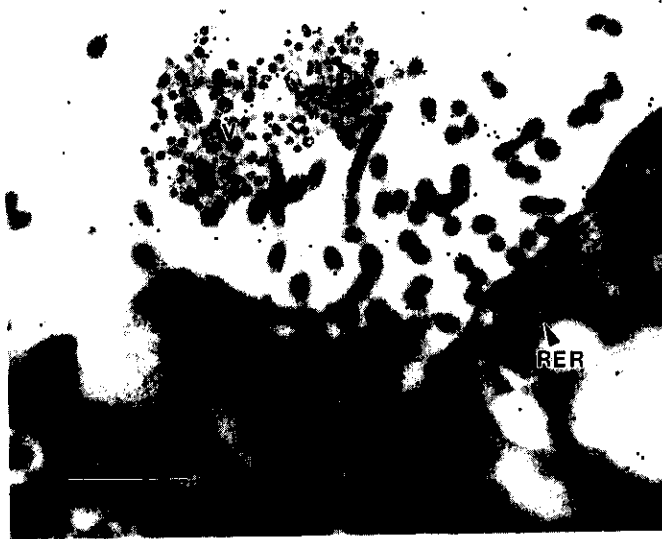


圖2 CPK細胞接種TGE病毒36小時，以Protein A-Gold進行膠體金染色，於細胞粗糙網狀內皮組織、空泡邊緣及細胞外之病毒集團，皆有特異性的膠體金染色。
RER: Rough endoplasmic reticulume V: Virus particle bar=500nm

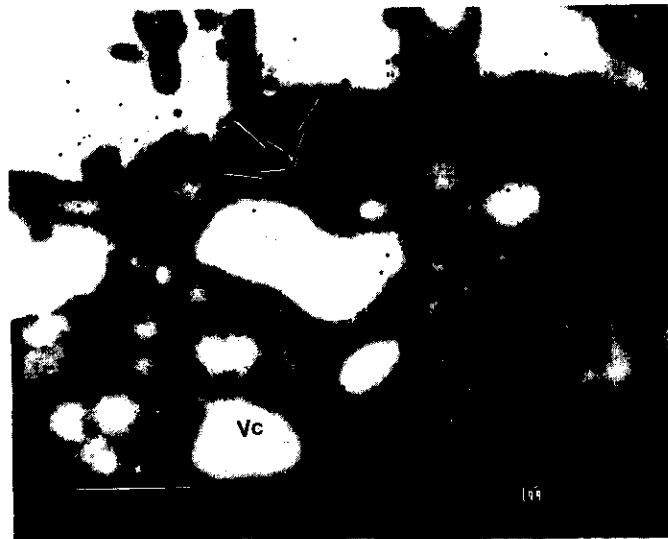


圖3 CPK細胞接種TGE病毒36小時，以Protein A-Gold進行膠體金染色於粗糙網狀內皮組織及細胞外之病毒顆粒皆有特異性的膠體金染色。
M: Mitochondria Vc: Vacuole V: Virus particle bar=500nm

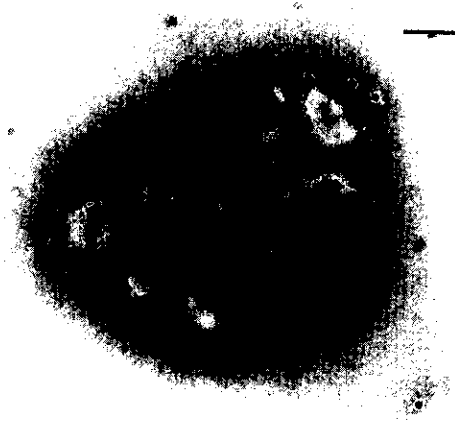


圖4 TGE病毒以豬抗TGE血清4℃感作一夜 Protein A-Gold 4℃感作6小時再進行負染色，可見病毒顆粒因抗體而凝集，具有特異性的膠體金染色。
bar = 100 nm



圖5 TGE病毒以TGE單株抗體4℃感作一夜，Protein A-Gold 4℃感作6小時再進行負染色，病毒顆粒周圍有特異性的膠體金染色。
bar = 100 nm

參 考 文 獻

1. Faulk, W.P., Taylor G.M. (1971) An immunogold method for the electron microscope. *Immunochemistry* 8: 1081-1083.
2. Garzon. S. Bendayan, M., Kurstak E. (1982). ultrastructural localization of viral antigens using protein A-gold technique. *J. Virol Methods* 5: 67-73.
3. Meckert, R.A., Saif, L.J. Myer, G.W. (1989). Development of protein A-gold immunoelectron microscopy for detection of bovine coronavirus in calves: Comparison with ELISA and direct immunofluorescence of nasal epithelial cells.
4. Patterson, S., Verduin, B.J.M. (1987). Application of immunogold labelling in animal and plant virology. *Arch. virol.* 97: 1-26.
5. Wood, E.N. (1980). Transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Rec.* 122: 86-87.

Ultrastructural localization of Swine Transmissible Gastroenteritis Virus Using an Immunogold Method

N.J. Li, Y.P. Lin, and T.S. Huang

Taiwan Provincial Research Institute for Animal Health

SUMMARY

Protein A-Colloidal gold immunoelectron microscopy (PAGIEM) has been employed to specifically detect Swine Transmissible Gastroenteritis virus in either swine anti-TGE serum or TGE monoclonal antibody treated negative stained fluid specimens. This rapid and sensitive immunoassay was found to be applicable to partially purified virus preparation.

Swine Transmissible Gastroenteritis virus antigen were labeled in L.R. White embedded ultrathin section of CPK cell, using protein A-colloidal gold. Antigens in the rough endoplasmic reticulum, lysosomelike particles, or virus clusters were tagged with 15nm gold particles.

Working with different viruses and antisera, protein A-Colloidal gold, can be used as an universal gold stain, instead of primary or secondary antibodies adsorbed to gold, without losing sensitivity or increasing background.